

·实验研究·

寒热型哮喘大鼠支气管平滑肌钙通道开放概率的差异

陈志斌^{1,2}, 吴丽娇¹, 王春娥¹, 陈可强¹

(1. 福建中医药大学附属第二人民医院, 福建 福州 350003; 2. 福建省中医药科学院, 福建 福州 350003)

摘要: 目的 探讨寒热型哮喘大鼠支气管平滑肌细胞(BSMCs)钙通道开放概率的差异,为寒热型哮喘诊断提供理论依据。方法 将18只SD大鼠按随机数字表法分为寒哮组、热哮组、正常对照组各6只。寒哮组、热哮组采用腹腔注射鸡卵清白蛋白溶液和氢氧化铝混悬液致敏制备支气管哮喘大鼠模型诱喘;运用脂多糖滴鼻、鸡卵清白蛋白溶液超声雾化,每次30 min,每日1次,连续7 d,出现烦躁、口渴、喘促等提示热哮组模型造模成功;使用鸡卵清白蛋白溶液超声雾化,每次30 min,每天1次,同时将大鼠放入寒箱内刺激,每次20 min,每天1次,连续7 d,直至出现身体颤抖、喘促等提示寒哮组造模复制成功。造模成功后,继续雾化激发及寒冷刺激4周。正常对照组大鼠以生理盐水进行腹腔注射,第15天开始,以生理盐水雾化激发。造模成功后取材对支气管平滑肌进行分离,经免疫组化鉴定为BSMCs,运用膜片钳技术细胞贴附式方法测定BSMCs不同Ca²⁺浓度的钙通道开放概率。结果 Ca²⁺浓度在0.5、1、3、10 μmol/L时,正常对照组、寒哮组、热哮组钙通道开放概率组间比较无差异(P>0.05),但随着Ca²⁺浓度增加,寒哮组、热哮组钙通道开放概率随之升高;Ca²⁺浓度在100 μmol/L时,与正常对照组比较,寒哮组、热哮组钙通道开放概率均升高(P均<0.01),且热哮组钙通道开放概率高于冷哮组(P<0.01)。结论 寒哮、热哮大鼠BSMCs钙通道开放概率随Ca²⁺浓度增加而升高;Ca²⁺浓度在100 μmol/L时,寒哮组、热哮组钙通道开放概率均升高,热哮组升高更明显。钙通道开放概率可作为寒热哮诊断的参考依据。

关键词:支气管哮喘;寒哮;热哮;支气管平滑肌细胞;钙通道开放概率

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1000-338X(2020)06-0026-03

DOI:10.13260/j.cnki.jfjtc.012125

支气管哮喘(哮喘)是临床常见的慢性气道炎症性疾病,主要以慢性气道炎症、气道重塑和气道高反应性为特征。近年来,人们逐渐认识到气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)在哮喘发病机制中的重要性。ASMCs不仅具备增殖能力,还可释放细胞因子、趋化因子、生长因子和血管生成因子^[1]。此外气道高反应通过ASMCs介导,与Ca²⁺浓度相关^[2]。气道平滑肌的收缩依赖于细胞内Ca²⁺浓度的升高,并且Ca²⁺参与平滑肌的兴奋耦联过程。支气管平滑肌细胞(bronchial smooth muscle cells, BSMCs)是ASMCs主要组成部分,维持支气管正常的舒张收缩功能。哮喘在中、西医诊断中均有各自分型,指导着临床治疗,而大量研究及临床实践证明中西医结合治疗疗效显著,因此本课题通过研究哮喘机制方法区分中医哮喘证型差异性,为哮喘治疗提供更精确的诊断依据。中医哮喘急性期多以寒哮、热哮型为主,而钙通道是气道上细胞重要的离子通道之一,研究中医哮喘证型钙通道开放概率的差异性对临床证型诊断有重要意义。本实验通过分离培养寒、热型哮喘SD大鼠模型,采用膜片钳技术细胞贴附式方法检测BSMCs内钙通道开放概率,研究寒、热型哮喘大鼠BSMCs钙通道变化,探讨其在寒热型哮喘发病中的意义。

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF级5~6周龄健康雄性大鼠,购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场,生产许可证号:SCXK(苏)2017-0001,动物合格证编号:201908685。饲养于SPF级动物实验室,恒温恒湿,模拟标准日夜系统(12 h光照/12 h黑夜),予以自由饮食及饮水。

1.2 主要试剂 鸡卵清白蛋白(VOA)、脂多糖、木瓜蛋白酶(美国Sigma公司,货号:A5503、S0130、P4762);戊巴比妥钠(上海隆盛化工有限公司, CAS:57-33-0);PBS缓冲液(南京生兴生物有限公司,货号:SN331);I型胶原酶(北京索莱宝科技有限公司,货号:C8140);胰酶、牛血清白蛋白(美国Hyclone公司,型号:SH30042.01、SH30070.03);DAB显色液、小鼠二抗(丹麦DAKO公司,货号:K3468、K4001);苏木素(珠海贝索生物技术有限公司,货号:BA-4097);氯化钾、氯化钙、氯化镁、氢氧化铝(上海凌峰化学试剂有限公司,货号:7447-40-7、10043-52-4、7786-30-3、21645-51-2、21645-51-2);多聚甲醛(南京化学试剂股份有限公司,货号:C0671510223);HEPES缓冲液(上海钦诚生物科技有限公司,货号:QC25-02540);小鼠一抗(英国Abcam公司,货号:ab7817)。

1.3 主要设备 雾化机(广东粤华医疗器械厂有限公司);DMEM培养基(美国Hyclone公司);T-25培养瓶(美国Corning公司);CO₂培养箱(美国Thermo fisher公司);荧光倒置显微镜(日本Nikon公司);微电极推制器、BF150-86-10 Sutter玻璃管(美国

收稿日期:2020-07-25

基金项目:福建省自然科学基金项目(2016J01566);林求诚(陈志斌)中医肺病学术流派传承工作室建设项目

作者简介:陈志斌(1960—),男,硕士生导师,中医主任医师。

E-mail:bin669@163.com

Sutter 公司);膜片钳放大器、数模/模数转换卡、低通滤波器、微型计算机软件(美国 Axon 公司)。

2 实验方法

2.1 实验分组及模型建立 参照参考文献[3-5]。将 18 只大鼠按数字表法随机分为正常对照组、寒哮组、热哮组,每组各 6 只,自由摄食、饮水 7 d 后开始造模。大鼠分别于造模第 1 天和第 8 天腹腔注射 VOA 和氢氧化铝混悬液 1 mL(鸡卵清白蛋白 100 mg 和氢氧化铝干粉 100 mg 溶于 1 mL 的生理盐水中)致敏诱喘,出现呼吸加快、竖毛、前肢缩抬、点头呼吸等。^①热哮组:第 1 天和第 8 天采用 0.4%戊巴比妥钠麻醉大鼠后,用移液管取脂多糖稀释液 40 μ L 于双侧鼻孔滴鼻;第 15 天开始以 1%VOA 溶液超声雾化,每次 30 min,每日 1 次,连续 7 d。以大鼠出现烦躁、汗多、口渴、点头、节律性收腹样喘促等现象,提示造模成功。^②寒哮组:第 15 天开始,将大鼠放入雾化箱内,以 1%VOA 超声雾化激发,每次 30 min,每天 1 次;同时将大鼠放入寒箱内(0~2 $^{\circ}$ C),每次 20 min,每天 1 次,连续 7 d。将大鼠激发至哮喘发作,出现点头、身体颤抖、节律性收腹样喘促现象等,表明造模成功。造模成功后,继续雾化激发及寒冷刺激 4 周。^③正常对照组:以生理盐水 1 mL 取代卵蛋白生理盐水混悬液进行腹腔注射;第 15 天开始,以生理盐水超声雾化激发。

2.2 支气管平滑肌的分离 腹腔注射大剂量戊巴比妥钠将 3 组大鼠处死后,将肺取出,置于含双抗的 PBS 缓冲液中漂洗,分离大鼠两侧肺组织中 3~4 级支气管,剪成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小的组织块;加入 2 mg/mL 型胶原酶和 2.5 mg/mL 木瓜蛋白酶,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 90 min,1 000 rpm 离心 8 min,去除上清,加入 0.125%胰酶 37 $^{\circ}$ C 消化 5 min,加入含血清的 DMEM 培养基终止消化,1 000 rpm 离心 8 min,去除上清,加入含血清的 DMEM 培养基重悬细胞,用 100 目筛过滤,用 DMEM 培养液反复冲洗、离心 2 次,即可得到含支气管平滑肌细胞的细胞悬液;将细胞悬液接种至 T-25 培养瓶中,放入培养箱中培养;3 d 后,更换培养基,待细胞长至 80%~90%融合度时,使用胰酶将细胞消化下来接种至 3 个培养瓶中,培养 2~3 代的细胞用于实验。

2.3 免疫组化鉴定 将分离的大鼠 BSMCs 铺板于培养皿内,制作细胞爬片,培养 24 h 后,去除培养液,PBS 缓冲液清洗后加入多聚甲醛固定 30 min;吸去多聚甲醛后,PBS 洗 3 次后加入 3%过氧化氢溶液,室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶;PBS 洗 3 次,每次 5 min,吸去 PBS 后加 5%牛血清白蛋白(BSA)封闭 20 min(封闭电荷);去除 BSA 液,每孔加入 100 μ L 1:200 稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 洗 3 次后每孔加 100 μ L 的二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;PBS 洗 3 次后,每张切片加 50~100 μ L 新鲜配制 DAB 溶液,显微镜控制显色;显色完全后,蒸馏水洗,苏木素复染,吸去苏木素,水洗,镜下拍照。

2.4 BSMCs 的钙通道开放概率记录 运用膜片钳技术细胞贴附式方法测定不同 Ca^{2+} 浓度 BSMCs 内钙通道开放概率。调节 P-1000 拉制仪参数(RAMP-20),使得 BF150-86-10 中空硅玻璃管入水阻值达到 8.0~10.0 兆欧;从培养箱中取出细胞,置于 BSMCs 外液(氯化钠 130 mmol/L、氯化钾 5 mmol/L、氯化钙 1 mmol/L、氯化镁 1 mmol/L、HEPES 缓冲盐水 20 mmol/L,pH7.4);用微电极电阻约为 3 兆欧,单通道电流经膜片钳放大器放大,探头反馈电阻为 10 千兆欧,低通滤波器滤波频率为 3 kHz。数据采集与分析:由计算机软件控制产生数字脉冲,经数/模(D/A)转换成模拟脉冲电压信号,控制细胞的膜电位,电流信号通过 0.1 千兆欧探头,经膜片钳放大器的电流电压转换输入到模/数转换卡变成数字信号,再经数据采集系统微型计算机软件,采集程序输入计算机。

2.5 统计学方法 运用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析。计量资料符合正态分布的以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;不符合正态分布的采用秩和检验,以[M(P25,P75)]表示。

3 结果

3.1 3 组钙通道开放概率比较 Ca^{2+} 浓度为 0.5、1、3、10 μ mol/L 时,3 组钙通道开放概率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。 Ca^{2+} 浓度为 100 μ mol/L 时,热哮组和寒哮组钙通道开放概率均较正常对照组升高(P 均 <0.01),热哮组钙通道开放概率较寒哮组升高更明显($P<0.01$)。见表 1。

表 1 3 组钙通道开放概率比较[($\bar{x}\pm s$)/M(P25,P75)]

组别	n	Ca^{2+} 浓度				
		0.5 μ mol/L	1 μ mol/L	3 μ mol/L	10 μ mol/L	100 μ mol/L
正常对照组	6	0.12 \pm 0.34	0.12 \pm 0.53	0.17 \pm 0.04	0.35(0.23,0.52)	0.45(0.42,0.55)
寒哮组	6	0.12 \pm 0.27	0.15 \pm 0.01	0.18 \pm 0.37	0.46(0.36,0.46)	0.58(0.56,0.61) ¹⁾
热哮组	6	0.13 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02	0.21 \pm 0.40	0.42(0.37,0.43)	0.68(0.61,0.70) ¹⁾²⁾

注:与正常对照组比较,1) $P<0.01$;与寒哮组比较,2) $P<0.01$ 。

4 讨论

ASMCs 参与哮喘气道炎症、气道重塑及气道高反应性的发生与发展过程。目前,对于哮喘研究大多

集中于整个气道,而针对 BSMCs 的研究较少涉及。钙通道是引起气道平滑肌收缩的主要通道^[6],游离钙是细胞内第二信使,细胞的存活及其功能的维

持依赖于细胞内 Ca^{2+} 的精密调节, 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高对 ASMCs 起维持和收缩作用。钙通道开放增加, 使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 引起气道平滑肌收缩^[7], 而气道平滑肌的收缩增强被认为可能是哮喘发生气道高反应的重要原因, 临床上应用支气管扩张剂可改善哮喘发作引起气道挛急、呼吸困难等症状, 进一步说明了气道高反应与 ASMCs 收缩有关。哮喘患者 ASMCs 钙通道开放增加, 细胞内 Ca^{2+} 浓度增加可使得哮喘患者气道的 ASMCs 处于无收缩的活性增加状态, 从而导致气道高反应性, 此时轻微的刺激即可诱发气道的痉挛^[8]。祖国医学将哮喘急性发作期分为热哮、寒哮两个证型^[9], 寒哮治以宣肺散寒、化痰平喘为主, 热哮治以清热宣肺、化痰定喘为主, 二者的治法存在明显区别。同为哮喘病, 中医分型治法却明显不同, 寒哮、热哮是否为哮喘病的 2 个亚型? 在不同钙浓度分布下钙通道开放概率两者是否存在差异性? 因此, 本试验运用膜片钳技术细胞贴附式方法检测寒、热型哮喘 SD 大鼠 BSMCs 内钙通道开放概率的变化, 探讨寒哮、热哮之间的差异。

本研究结果表明: 随着 Ca^{2+} 浓度的增加, 寒、热型哮喘大鼠钙通道开放概率也不断地增加, 热哮组、寒哮组较正常对照组钙通道开放概率增加明显, 说明钙通道开放概率的变化可作为哮喘的分型指标。当 Ca^{2+} 浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 时, 寒、热型哮喘大鼠的钙通道开放概率增加程度较正常对照组明显, 且热

哮组钙通道开放概率较寒哮组明显增加, 说明寒、热型哮喘大鼠在不同钙浓度下钙通道开放概率有本质上的差异。因此, 钙通道开放概率明显增加, 临床应考虑热哮的可能, 钙通道开放概率轻度增加时, 临床上应考虑寒哮的可能。今后, 我们将进一步深入研究, 探讨钙通道开放概率对寒、热哮诊断的具体折点, 以期通过对钙通道开放概率的测定, 作为寒热哮的诊断指标。

参考文献

- [1] 陈晶. 支气管哮喘中的气道平滑肌细胞作用的研究进展[J]. 右江医学, 2017, 45(1): 95-97.
- [2] 朱晓洁, 王珺, 张予阳. 多机制多通路参与哮喘新说[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(4): 325-330.
- [3] 方向明, 严郑元, 李泽庚, 等. 龙麻金宁方对热哮大鼠肺组织 PKBmRNA、 α -SMAmRNA 表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(2): 5-8.
- [4] 王智星. 平喘宁调节 ERK 信号通路对寒哮大鼠肺组织 TGF- β 1、CyclinD1 及 EGFmRNA、PDGFmRNA 表达的研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2014: 10-11.
- [5] 李志勇, 孙建宁, 张硕峰. 水合氯醛和戊巴比妥钠对 SD 大鼠麻醉效果的比较[J]. 四川动物, 2008, 27(2): 299-302.
- [6] 韩君萍, 李双, 赵叶, 等. 支气管哮喘气道炎症发病机制及针刺调节的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(22): 19-23.
- [7] 王忠慧, 马忠森, 周及红, 等. 哮喘豚鼠模型支气管平滑肌钙通道特性的变化[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(9): 30-32.
- [8] 李昌辉, 马忠森. 乙酰胆碱对豚鼠支气管平滑肌细胞膜钙、钾通道的影响[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(12): 1187-1188.
- [9] 张伯礼, 吴勉华. 中医内科学[M]. 4 版. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 55.

Difference of Calcium Channel Opening Probability of Bronchial Smooth Muscle in Rats with Cold-Heat Asthma

CHEN Zhibin^{1,2}, WU Lijiao¹, WANG Chun'e¹, CHEN Keqiang¹

¹ The Second Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China

² Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China

ABSTRACT Objective: To investigate the difference of calcium channel opening probability of bronchial smooth muscle cells (BSMCs) in rats with cold and heat asthma, and to provide theoretical basis for the diagnosis of cold and heat type asthma. **Methods:** A total of 18 Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into a cold asthma group, a heat asthma group and a normal control group with 6 rats in each group. Cold asthma group and heat asthma group were sensitized by intraperitoneal injection of chicken ovalbumin solution and aluminum hydroxide suspension to induce asthma in rats. Lipopolysaccharide nasal drops and chicken egg albumin solution were used for ultrasonic atomization, 30 minutes each time, once a day, for 7 consecutive days, and irritability, thirst and shortness of breath appeared, which indicated that the hot asthma group model was successfully reproduced. At the same time, the rats were put into the cold box to stimulate, 20 minutes each time, once a day, for 7 days, until the body shaking, shortness of breath and so on, which indicated that the cold asthma group model was successfully reproduced. After the successful establishment of the model, the atomization and cold stimulation were continued for 4 weeks. Rats in the normal control group were intraperitoneally injected with normal saline. From the 15th day, the rats were stimulated with normal saline. After successful modeling, the bronchial smooth muscle was isolated and identified as BSMCs by immunohistochemistry. The calcium channel opening probability of BSMCs with different Ca^{2+} concentrations was measured by patch clamp technique. **Results:** When the concentration of Ca^{2+} was 0.5, 1, 3, 10 μm , there was no significant difference in the calcium channel opening probability between the normal control group, cold asthma group and heat asthma group ($P>0.05$), but with the increase of Ca^{2+} concentration, the calcium channel opening probability in cold asthma group and heat asthma group increased. When the concentration of Ca^{2+} was 100 μm , the opening probability of calcium channel in cold asthma group and heat asthma group increased ($P<0.01$). The probability of calcium channel opening in heat asthma group was higher than that in cold asthma group ($P<0.01$). **Conclusion:** The calcium channel opening probability of BSMCs in cold asthma and heat asthma rats increases with the increase of Ca^{2+} concentration. When the concentration of Ca^{2+} was 100 μm , the opening probability of calcium channel in cold asthma group and heat asthma group increased. The calcium channel opening probability can be used as a reference for diagnosis of cold and heat asthma.

KEY WORDS bronchial asthma; cold asthma; heat asthma; bronchial smooth muscle cells; calcium channel opening probability